

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年11月8日 (08.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/82977 A1

(51) 国際特許分類: A61K 49/04, 9/127, 47/24, 47/28 (74) 代理人: 今村正純, 外 (IMAMURA, Masazumi et al.)

; 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03629

(22) 国際出願日: 2001年4月26日 (26.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-130069 2000年4月28日 (28.04.2000) JP
特願2001-18573 2001年1月26日 (26.01.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 富士写真フィルム株式会社 (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) [JP/JP]; 〒250-0193 神奈川県南足柄市中沼210番地 Kanagawa (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 相川和広 (AIKAWA, Kazuhiro) [JP/JP]; 北口博司 (KITAGUCHI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒250-0193 神奈川県南足柄市中沼 210番地 富士写真フィルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HP, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: LIPOSOMES CONTAINING HYDROPHOBIC IODO COMPOUND

(54) 発明の名称: 疎水性ヨード化合物を含むリポソーム

(57) Abstract: Liposomes containing as a membrane constituent a hydrophobic iodo compound such as a 1,3,5-triiodobenzene derivative having at least one substituent carrying 18 or more carbon atoms (for example, cholesterol derivative); and X-ray contrast media to be used in the contrast method for vascular diseases, etc. which contain the above liposomes.

(57) 要約:

コレステロール誘導体などの炭素数18以上の置換基を少なくとも1個有する1、3、5-トリヨードベンゼン誘導体などの疏水性ヨード化合物を膜構成成分として含むリポソーム、及び、血管疾患の造影などに用いるための該リポソームを含むX線造影剤。

WO 01/82977 A1

明細書

疎水性ヨード化合物を含むリポソーム

技術分野

本発明はリポソームに関するものであり、より具体的には、疎水性ヨード化合物を疾患部位に選択的に集積させ、非疾患部位とコントラストをつけて造影する方法に利用可能なりポソームに関するものである。

背景技術

現代社会、特に先進国社会においては、高カロリー・高脂肪の食事を取り機会が増大している。そのために、動脈硬化症が原因となる虚血性疾患（心筋梗塞・狭心症等の心疾患、脳梗塞・脳出血等の脳血管疾患）の死亡者数が増加しており、この症状を初期の段階で診断し適切な治療を行うことが求められている。しかし、上記疾患が発症する以前に動脈硬化の進行を初期の段階で診断する満足できる方法は存在しない。

動脈硬化症の診断方法としては、非侵襲的な方法と、動脈にカテーテル等を挿入する侵襲的な方法に大別される。このうち非侵襲的方法の主なものはX線血管造影と超音波であるが、初期の動脈硬化、特に心筋梗塞や狭心症の原因となる冠状動脈の狭窄を初期の段階で発症前に検出することはほとんど不可能である。

非侵襲的な方法としては他にCT、MRIなども用いられることがあるが、これらは主として腫瘍の発見のために開発された方法であり、動脈硬化病巣の解像度に問題があるばかりでなく、高値で大かがりな装置を必要とするため、実施できる病院数も限られ一般には利用されていない。またラジオアイソトープを用いる方法も検討されているが、実験の枠を出ていない。

一方侵襲的な方法としては、血管内エコー、血管内視鏡等が用いられている。これらの方法によると動脈硬化の病巣を0.1mmの厚さまで測定することが可能と

言われている。しかし、これらの方法は、カテーテルの先に装着した超音波発振器、内視鏡を動脈内に挿入する必要がある。これは患者に大きな肉体的精神的な負担を強いると共に、危険も伴う。従って、心筋梗塞等の発作をおこした患者の治療や二次予防のために実施されてはいるものの、発症以前の人に動脈硬化の有無もしくは進行を診断する目的には使用できない。

これらのうち、動脈の狭窄部位の特定に最も広く用いられているのはX線血管造影である。これは、水溶性のヨード造影剤を投与することにより血液の流れを造影し、その流れが滞っている箇所をみつける方法である。しかし、この方法では、通常狭窄が 50 %以上進んだ病巣しか検出することができず、虚血性疾患の発作が発症する前に病巣を検出することは困難である。

これとは別に、疎水性ヨード造影剤もしくは親水性造影剤を製剤化し、目的とする疾患部位に選択的に集積させる試みが報告されている(国際公開 W095/19186、同 W095/21631、同 W089/00812、英国特許第 867650 号、国際公開 W096/00089、同 W094/19025、同 W096/40615、同 W095/2295、同 W098/41239、同 W098/23297、同 W099/02193、同 W097/06132、米国特許第 4192859 号明細書、同 4567034 号明細書、同 4925649 号明細書、Pharm. Res., 16(3), 420 (1999), J. Pharm. Sci., 72(8), 898 (1983), Invest. Radiol., 18(3), 275 (1983))。例えば Pharm. Res., 16(3), 420 (1999) には、疎水性化合物である Cholesteryl Iopanoate の油滴分散液を注射することにより、該ヨード化合物が実験動物の動脈硬化部位に集積することが開示されている。

また、J. Pharm. Sci. 72(8), 898 (1983) には、Cholesteryl Iopanoate の油滴分散液を注射することによる肝臓や脾臓の X 線造影の例が開示されている。米国特許第 4567034 号明細書には、diatrizoic acid のエステル体をリポソームに封入し、肝臓や脾臓の選択的造影を行う方法が報告されている。国際公開 W096/28414、同 W096/00089 には血管プールやリンパ系をイメージ化するための造影剤が開示されている。しかしながら、これらの製剤方法は、血管疾患を選択的に造影する目的のためには、効率および選択性ともに十分でなく、X 線照射によ

り血管疾患を画像化した例も報告されていない。

一方、近年動脈疾患の発症機構について遺伝子、タンパク質、細胞の各レベルで解明が進んできた (J. Biol. Chem. 1996, 271(44) 27346-52; Nature 386 (6662) 292-6)。動脈硬化に関して言えば、複数の細胞が互いの増殖を調節しながら病巣を形成することが明らかにされてきた (Arterioscler. Throm. Vasc. Biol. 1999 (3) 461-71; Lab Invest 1998 78(4) 423-34)。こうした複数の細胞が関与する病巣の状態を細胞培養器内で再現した例はなく、動脈硬化や再狭窄の薬剤の評価はこれまで主としてモデル動物を通して行われてきた。

しかし、こうした動物を用いる方法はいずれも時間、コストがかかり、さらに動物愛護の観点からも必要最小限にすることが求められている。従って、多数の化合物を短時間でスクリーニングするために、動脈硬化病巣の状態を再現した *in vitro* 評価法が待ち望まれていた。

発明の開示

本発明の課題は、動脈硬化やPTCA後の再狭窄等の血管平滑筋の異常増殖に起因する血管疾患部位に対して選択的にヨード化合物を集積させるための手段を提供することにある。その手段を用いることにより、血管疾患などの生体内環境をX線造影により画像化することも本発明の別の課題である。本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、疎水性ヨード化合物を膜構成成分の一つとして含むリポソームが、動脈硬化巣の主構成成分である血管平滑筋及び泡沫化マクロファージに集積することを見出した。

また、本発明の別の課題は、動脈硬化や再狭窄等の病巣の状態を再現した細胞培養系及びその作成方法を提供することである。この手段を用いることにより、動脈疾患に対する薬剤の評価法を提供することも本発明の課題である。本発明者らは上記の課題を解決すべく研究を行った結果、同一細胞培養器内で哺乳類動物の病巣を形成する2種類以上の細胞種を同時に培養することにより、動脈硬化巣や再狭窄などの病巣の状態を再現した細胞培養系を提供できることを見出した。

本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明は、疎水性ヨード化合物を膜構成成分として含むリポソームを提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、疎水性ヨード化合物が、炭素数18以上の置換基を少なくとも1個有する1, 3, 5-トリヨードベンゼン誘導体である上記リポソーム；ホスファチジルコリン及びホスファチジルセリンからなる群から選ばれる脂質を膜構成成分として含む上記リポソーム；炭素数6以上のアルキルのジエステルであるリン酸ジアルキルエステルを膜構成成分として含む上記リポソーム；及び炭素数18以上の置換基がコレステロール誘導体の残基である上記リポソームが提供される。

別の観点からは、上記リポソームを含むX線造影剤が提供される。この発明の好ましい態様によれば、血管疾患の造影、好ましくは泡沫化マクロファージの影響で異常増殖した血管平滑筋細胞、例えば動脈硬化巣やPTCA後の再狭窄の造影に用いるための上記X線造影剤が提供される。また、血管疾患の造影方法であって、上記リポソームを用いてX線造影する工程を含む方法、及び上記X線造影剤の製造のための上記リポソームの使用が本発明により提供される。

さらに別の観点からは、本発明により、同一細胞培養器内で哺乳類動物疾患の病巣形成に関与する2種類以上の細胞種を同時に培養する工程を含む培養系の作成方法が提供される。この発明の好ましい態様によれば、細胞種が生体から分離した初代培養細胞又は株化された継代細胞である上記の方法；細胞種が哺乳類動物の初代培養細胞である上記の方法；及び哺乳類動物疾患がヒトの疾患である上記の方法が提供される。

上記発明のさらに好ましい態様によれば、細胞種の少なくとも1つが動脈硬化病巣形成に関与する細胞である上記の方法；細胞種がマクロファージ、血管平滑筋細胞、及び血管内皮細胞からなる群から選ばれる上記の方法；2種類の細胞種を同一細胞培養器内でセル・フィルターを隔てて培養する工程を含む上記の方法；及び2種類の細胞種がマクロファージ及び血管平滑筋細胞である上記の方法が提供される。この発明の特に好ましい態様によれば、動脈硬化病巣の形成に關

与する哺乳類初代培養細胞2種類をセル・フィルターで隔てながら同一培養器内で培養し、動脈硬化病巣の状態を再現した培養系を作成する方法が提供される。

さらに、本発明により、上記の培養系の作成方法により得ることができる細胞培養系が提供される。また、上記の培養系の作成方法により得ることができる細胞培養系を用いて薬剤をスクリーニングする方法も本発明により提供される。好ましい態様として、泡沫化させたマクロファージ及び血管平滑筋細胞をセル・フィルターを隔てて培養することにより増殖させた血管平滑筋細胞に対する薬剤の作用を測定する工程を含む、血管疾患に対する薬剤の有効性の判定方法；及び泡沫化させたマクロファージ及び血管平滑筋細胞をセル・フィルターを隔てて培養することにより増殖させた血管平滑筋細胞に対する薬剤の作用を測定する工程を含む、薬剤の血管疾患病巣への移行性の評価方法が本発明により提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、マウス泡沫化マクロファージの存在下でマウス血管平滑筋細胞の増殖が誘導される結果を示す。

第2図は、マウス泡沫化マクロファージを加えない場合のマウス血管平滑筋細胞の増殖曲線を示す。

第3図は、ラット泡沫化マクロファージの存在下でラット血管平滑筋細胞の増殖が誘導される結果を示す。

第4図は、ウサギ泡沫化マクロファージの存在下でウサギ血管平滑筋細胞の増殖が誘導される結果を示す。

第5図は、マウス血管平滑筋細胞によるリポソームの取り込みを示す。①は第2図に示されるマウス泡沫化マクロファージを加えない培養系において、3日後にリポソーム製剤を加えて1日間培養した結果を示し；②は第1図に示されるマウス泡沫化マクロファージを加える培養系において、5日後にリポソーム製剤を加えて1日間培養した結果を示し；③は第1図に示されるマウス泡沫化マクロファージを加える培養系において、7日後にリポソーム製剤を加えて1日間培養し

た結果を示す。

第6図は、本発明のリポソームに替えて油滴懸濁剤を用いた場合の結果を示す。

第7図は、第3図の培養条件培養されたラット血管平滑筋細胞によるリポソームの取り込みを示す。①、②、③は第5図と同義である。

第8図は、第4図の培養条件培養されたウサギ血管平滑筋細胞によるリポソームの取り込みを示す。①、②、③は第5図と同義である。

第9図は、本発明のリポソームを用いて動脈硬化巣をX線撮影により造影した結果を示す写真である。図中、「投与前」はリポソーム投与前の結果を示し、「投与直後」はリポソームの投与直後の結果を示す。

第10図は、本発明のリポソームを用いて動脈硬化巣をX線撮影により造影した結果を示す写真である。図中、「投与15分後」はリポソーム投与15分後の結果を示し、「投与30分後」はリポソーム投与30分後の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

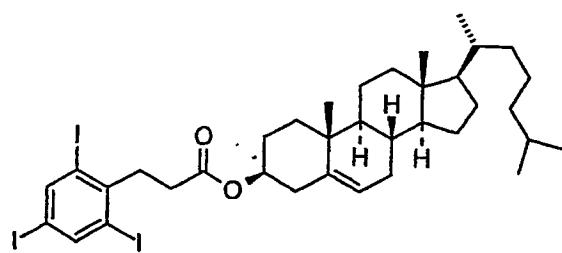
疎水性ヨード化合物の種類は特に限定されないが、例えばヨードベンゼン誘導体が好ましく、炭素数18以上の置換基を少なくとも一個有する1, 3, 5-トリヨードベンゼン誘導体であることがより好ましい。炭素数18以上の置換基としては、ヨード造影部位である1, 3, 5-トリヨードベンゼン残基をリポソームの脂質二重層に安定に存在させるための疎水性基であることが好ましく、例えば、炭素数が20以上で、酸素原子数と窒素原子数の合計が10以下であるものがより好ましい。該疎水性置換基は生体膜脂質構成成分と類似構造であることがさらに好ましい。こうした条件を満たす疎水性ヨード化合物の好ましい例としては、例えば、J. Med. Chem. 25(12), 1500 (1982); Steroids 49(6), 531 (1987); Pharm. Res. 6(12), 1011 (1989); 国際公開 W095/19186; 同 W096/28414 等に開示されているコレステロール誘導体の残基を置換基として有する1, 3, 5-トリヨードベンゼン誘導体が挙げられる。

コレステロール誘導体としては、上記の刊行物に開示されたものが好ましいが、

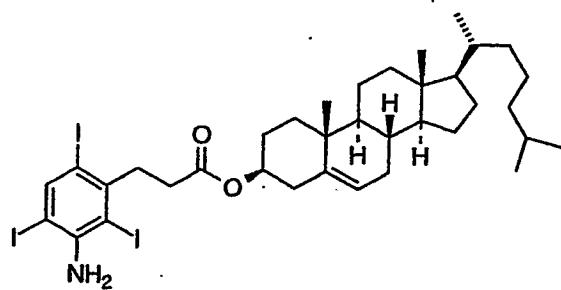
特に好ましいのはコレステロールである。コレステロールが3位水酸基を介して疎水性ヨード化合物、例えば1, 3, 5-トリヨードベンゼンと連結した化合物が好ましい。コレステロールの水酸基と疎水性ヨード化合物、例えば1, 3, 5-トリヨードベンゼンとを結合する方法としては、例えば、エステル結合、エーテル結合、ウレタン結合、炭酸エステル結合等の手段を用いることができるが、エステル結合が好ましい。コレステロールと疎水性ヨード化合物、例えば1, 3, 5-トリヨードベンゼンとは、上記の結合を介して直接結合していてもよいし、適當な連結基を介して結合していてもよい。適當な連結基の例としては、炭素数が5以下の直鎖状又は分岐鎖状のアルキレン基が挙げられる。

疎水性ヨード化合物、好ましくは1, 3, 5-トリヨードベンゼン化合物は、上記した炭素数18の置換基以外に、1又は2以上の置換基を有していてもよい。置換基の種類及び置換位置は特に限定されないが、例えば、置換若しくは無置換のアミノ基、置換若しくは無置換のアシルアミノ基、水酸基、カルボキシル基等が疎水性ヨード化合物のベンゼン環上に置換していることが好ましい。好ましい置換基は置換若しくは無置換のアミノ基、又は置換若しくは無置換のアシルアミノ基である。アミノ基が置換基を有する場合として、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基などを挙げることができ、アシルアミノ基が置換基を有する場合として、トリフルオロアセチルアミノ基、p-クロロベンゾイルアミノ基などを例示することができる。

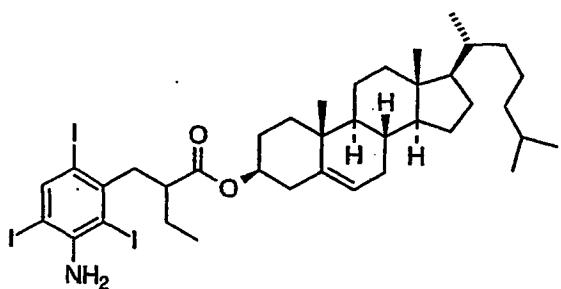
以下に疎水性ヨード化合物として好ましい例を挙げるが、本発明のリポソームはこれらを含むものに限定されることはない。



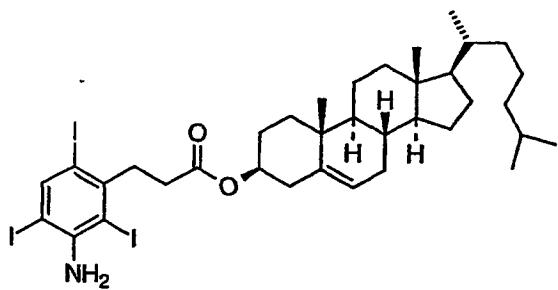
化合物(1)



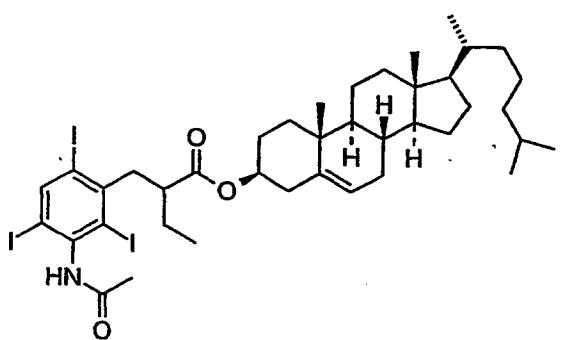
化合物(2)



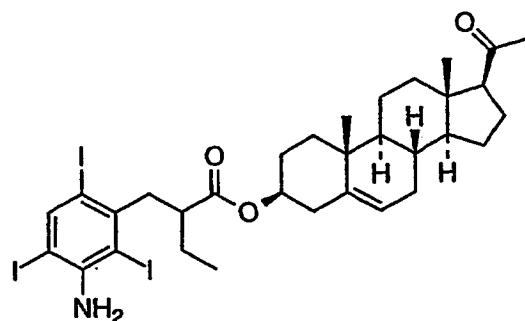
化合物(3)



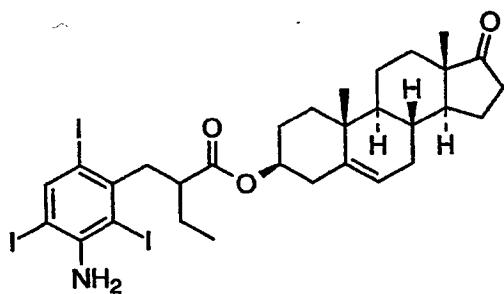
化合物(4)



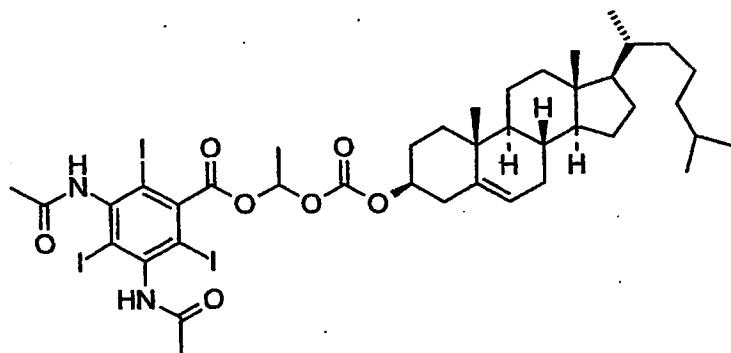
化合物(5)



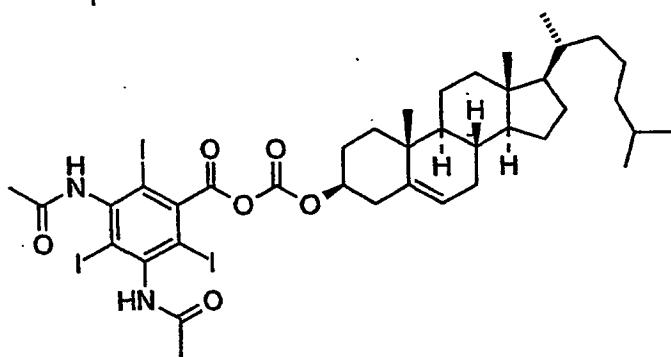
化合物(6)



化合物(7)



化合物(8)



化合物(9)

疎水性ヨード化合物はリポソームの膜構成成分として含まれるが、膜構成成分の全質量に対して10から90質量%程度、好ましくは10から80質量%、さらに好ましくは20から80質量%である。疎水性ヨード化合物は膜構成成分と

して1種類を用いてもよいが、2種類以上を組み合わせて用いてもよい。

リポソームの他の膜構成成分としては、リポソームの製造に通常用いられている脂質化合物をいずれも用いることが可能である。例えば、*Biochim. Biophys. Acta* 150(4), 44 (1982)、*Adv. in Lipid. Res.* 16(1) 1 (1978)、"RESEARCH IN LIPOSOMES" (P. Machy, L. Leserman著、John Libbey EUROTEXT社)、「リポソーム」(野島、砂本、井上編、南江堂)等に記載されている。脂質化合物としてはリン脂質が好ましく、特に好ましいのはホスファチルジルコリン(PC)類である。ホスファチルジルコリン類の好ましい例としては、eggPC、ジミリストリルPC(DMPC)、ジパルミトイルPC(DPPC)、ジステアロイルPC(DSPC)、ジオレイルPC(DOPC)等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

本発明の好ましい態様では、リポソームの膜構成成分として、ホスファチルコリンとホスファチルセリン(PS)を組み合わせて用いることができる。ホスファチルセリンとしては、ホスファチルコリンの好ましい例として挙げたリン脂質と同様の脂質部位を有する化合物が挙げられる。ホスファチルコリンとホスファチルセリンを組み合わせて用いる場合、PCとPSの好ましい使用モル比はPC:PS=90:10から10:90の間であり、さらに好ましくは、30:70から70:30の間である。

本発明のリポソームの別の好ましい態様によると、膜構成成分として、ホスファチルコリンとホスファチルセリンを含み、さらにリン酸ジアルキルエステルを含むリポソームが挙げられる。リン酸ジアルキルエステルのジアルキルエステルを構成する2個のアルキル基は同一であることが好ましく、それぞれのアルキル基の炭素数は6以上であり、10以上が好ましく、12以上がさらに好ましい。好ましいリン酸ジアルキルエステルの例としては、ジラウリルfosfate、ジミリストルfosfate、ジセチルfosfate等が挙げられるが、これに限定されることはない。この態様において、ホスファチルコリン及びホスファチルセリンの合計質量に対するリン酸ジアルキルエステルの好ましい使用量は1から50質量%までであり、好ましくは1から30質量%であり、さら

に好ましくは1から20質量%である。

ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、リン酸ジアルキルエステル、及び疎水性ヨード化合物を膜構成成分として含むリポソームにおいて、上記成分の好ましい質量比はP C : P S : リン酸ジアルキルエステル : 疎水性ヨード化合物が5～40質量% : 5～40質量% : 1～10質量% : 15～80質量%の間で選択することができる。

本発明のリポソームの構成成分は上記4者に限定されず、他の成分を加えることができる。その例としては、コレステロール、コレステロールエステル、スフィンゴミエリン、FEBS Lett. 223, 42 (1987); Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 6949 (1988)等に記載のモノシアルガンギリオシドGM1誘導体、Chem. Lett., 2145 (1989); Biochim. Biophys. Acta, 1148, 77 (1992)等に記載のグルクロン酸誘導体、Biochim. Biophys. Acta, 1029, 91 (1990); FEBS Lett., 268, 235 (1990)等に記載のポリエチレングリコール誘導体が挙げられるが、これに限られるものではない。

本発明のリポソームは、当該分野で公知のいがなる方法でもっても作成できる。作成法の例としては、先に挙げたリポソームの総説成書類の他、Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980)、"Liposomes" (M. J. Ostro 編、MARCELL DEKKER, INC.)等に記載されている。具体例としては、超音波処理法、エタノール注入法、フレンチプレス法、エーテル注入法、コール酸法、カルシウム融合法、凍結融解法、逆相蒸発法等が挙げられるが、これに限られるものではない。本発明のリポソームのサイズは、上記の方法で作成できるサイズのいずれであっても構わないが、通常は平均が400 nm以下であり、200 nm以下が好ましい。リポソームの構造は特に限定されず、例えばユニラメラ又はマルチラメラのいずれでもよい。また、リポソームの内部に適宜の薬物や他の造影剤の1種又は2種以上を配合することも可能である。

本発明のリポソームを造影剤として用いる場合には、好ましくは非経口的に投与することができ、より好ましくは静脈内投与することができる。例えば、注射

剤や点滴剤などの形態の製剤を凍結乾燥形態の粉末状組成物として提供し、用時に水又は他の適当な媒体（例えば生理食塩水、ブドウ糖輸液、緩衝液など）に溶解ないし再懸濁して用いることができる。本発明のリポソームを造影剤として用いる場合、投与量はリポソームのヨード含有量が、従来の疎水性ヨード造影剤のヨード含有量と同程度になるように適宜決定することが可能である。

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、動脈硬化、もしくはPTCA後の再狭窄等の血管疾患においては、血管の中膜を形成する血管平滑筋細胞が異常増殖をおこすと同時に内膜に遊走し、血流路を狭くすることが知られている。正常の血管平滑筋細胞が異常増殖を始めるトリガーはまだ完全に明らかにされていないが、マクロファージの内膜への遊走と泡沫化が重要な要因であることが知られており、その後に血管平滑筋細胞がフェノタイプ変換（収縮型から合成型）をおこすことが報告されている。

本発明のリポソームを用いると、泡沫化マクロファージの影響で異常増殖した血管平滑筋に対して疎水性ヨード化合物を選択的に取りこませることができる。その結果、病巣と非疾患部位とをコントラストをつけて造影することができる。従って、本発明の造影剤は、特に血管疾患のX線造影に好適に使用でき、例えば、動脈硬化巣やPTCA後の再狭窄等の造影を行うことができる。造影の方法は特に限定されない。例えば、X線照射による方法、又はヨードの放射線ラベル体を用いる核医学的方法などが挙げられるが、これらに限定されることはない。

本発明により提供される培養系の作成方法は、哺乳類動物疾患の病巣の形成に関与する2種類以上の細胞種を同一細胞培養器内で培養する工程を含むことを特徴としている。細胞種としては初代細胞培養又は株化継代培養細胞が好ましく、哺乳類細胞の初代培養細胞が特に好ましい。好ましい哺乳動物としては、ヒト、イヌ、ネコ、ブタ、ミニブタ、ウサギ、ハムスター、ラット、マウス等が挙げられるがこれに限定されるものではない。細胞培養器の種類は特に限定されないが、例えば培養フラスコ、培養試験管、シャーレ、マイクロプレートなどを好適に用いることができる。

同一培養器内で培養する 2 種類以上の異なる細胞種は、同種の動物由来又は異種の動物由来の細胞種のいずれであっても構わないが、同種であることが好ましい。本明細書において「病巣の形成に関与する」という用語は複数の細胞が互いの増殖を調節しながら病巣を形成する場合などを含めて最も広義に解釈する必要があり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。異なる細胞種としては、細胞生物学又は細胞分類学上の観点から異なる細胞を選択することが好ましいが、ある病巣において共存し、互いの増殖を調節しながら病巣を形成する 2 種類の細胞を選択することがさらに好ましい。例えば、動脈硬化巣において共存するマクロファージと血管平滑筋細胞を 2 種類の細胞種として選択することが好ましい。

本発明の培養系の作成方法の好ましい態様では、2 種類の細胞種をセル・フィルターで隔てながら同一ウエル内で培養することができる。本発明の別の好ましい態様によれば、用いる 2 種類の細胞種は動脈硬化病巣を形成する細胞であることが好ましい。好ましい細胞種としては、マクロファージ、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、T 細胞、肥満細胞等が挙げられる。この中でも好ましいのは、マクロファージ、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞であり、特に好ましいのは、マクロファージ及び血管平滑筋細胞の組み合わせである。この場合、マクロファージはあらかじめ泡沫化させておくことが好ましい。

本発明により、泡沫化させたマクロファージ及び血管平滑筋細胞をセル・フィルターを隔てて培養することにより増殖させた血管平滑筋細胞に対する薬剤の作用を測定する工程を含む、薬剤の血管疾患病巣への移行性の評価方法が提供される。本明細書において用いられる「薬剤の作用」という語は、治療効果又は診断効果などを含めて最も広義に解釈する必要がある。セル・フィルターは泡沫化したマクロファージ及び血管平滑筋細胞を通過させない程度の孔径のものであれば、その種類は特に限定されない。例えば、細胞を通過させないポアサイズとして 0.4 μm 以下のポアサイズのセルフィルターを用いることができるが、泡沫化したマクロファージや用いる細胞の種類に応じて、適宜のポアサイズのセルフィルター

を容易に選択することができる。

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、泡沫化させたマクロファージ及び血管平滑筋細胞をセル・フィルターを隔てて培養することにより、泡沫化したマクロファージ由来の増殖活性化物質が血管平滑筋細胞に作用して増殖を誘起し、動脈硬化やPTCA後の再狭窄などの血管疾患における血管平滑筋細胞の異常増殖をイン・ビトロで再現することができる。増殖した血管平滑筋細胞に対する薬剤の取り込みを調べることによって、動脈硬化やPTCA後の再狭窄などの血管疾患に有効性の高い薬剤をスクリーニングすることが可能である。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1：泡沫化マクロファージにより増殖活性化する血管平滑筋培養系の作成（1）マウス大動脈内皮より、血管平滑筋細胞を分離した（組織培養法改定大10版、講談社、1998年、日本組織培養学会編集）。分離した血管平滑筋細胞を10%FBSイーグルMEM培地（GIBCO社製 No.11095-080）に懸濁し、12穴マイクロプレート（FALCON社製、No.3503）に播種した。この時の各wellの細胞数は10,000個に調整した。37°C、5%CO₂の条件で3日間培養した。

次に、Biochimica Biophysica Acta誌、1213巻、127-134頁（1994）記載の方法により、泡沫化したマウス腹腔マクロファージを調製した。この泡沫化マクロファージ200,000個を分離し、上記底面に血管平滑筋細胞を培養したマイクロプレートの各wellの上部にインサートセル（FALCON社製、No.3180）に播種した。37°C、5%CO₂の条件で5日間培養した。第1図に上記実験における血管平滑筋細胞の細胞数を示す。培養開始当初の増殖は緩やかであるが、3日後に泡沫化マクロファージを加えた後、約1日の誘導期を経て活発な増殖を示した。マクロファージを加えない場合の血管平滑筋細胞の増殖曲線を第2図に示す。第1図との比較によ

り泡沫マクロファージによる増殖活性化効果は明らかである

例2：血管平滑筋上のスカベンジャー・レセプター発現の確認

動脈硬化病巣における血管平滑筋細胞は、表面にスカベンジャー・レセプターを発現して酸化LDLを取りこむことが知られている (Biochem. Pharmacol. 1999, 15; 57(4) 383-6; Exp. Mol. Pathol. 1997 64(3) 127-45)。第1図の培養系における血管平滑筋細胞に対して、マウススカベンジャー・レセプター抗体を使用して免疫染色を行った結果、播種3日目の血管平滑筋細胞には発現を認めなかつたが、播種6日目では明瞭な染色が確認された。なお、セル・フィルター上の泡沫化させたマクロファージを同様に免疫染色したところ、やはり明瞭な染色が認められた。

例3：血管平滑筋細胞による酸化LDLの取りこみ

第1図の培養系において、播種3日目および6日目において血管平滑筋細胞の培地に¹²⁵Iで標識した酸化LDLを添加し、24時間後に細胞に取り込まれた¹²⁵Iをカウントした結果を表1に示す。3日目と6日目では、明らかな取りこみ量の差が認められた。以上の結果より、本発明の細胞培養系により培養された血管平滑筋細胞が、動脈硬化または再狭窄等の病巣の平滑筋細胞と同様の性質を有していることが示された。

表1

日数	¹²⁵ I-oxLDL取り込み
播種3日目	0.52±0.11
播種6日目	2.2±0.4

×10,000 cpm

例4：泡沫化マクロファージにより増殖活性化する血管平滑筋培養系の作成(2)

例1と同様の方法で、ラットおよびウサギのマクロファージおよび血管平滑筋

細胞からなる培養系を作成した。第3図および第4図に血管平滑筋細胞の細胞数を示す。いずれの場合も第1図のマウスの場合と同様の結果が得られた。

第1図の培養系で培養された血管平滑筋細胞は、播種3日目までは健康な血管の性質を有し、播種7日目以降は動脈硬化病巣の平滑筋細胞の性質を有しているため、この両者に対する影響を比較することで、病巣に選択的な薬剤のスクリーニングを行うことができる。特に、病巣に選択的な薬剤送達系の探索、病巣細胞に選択的毒性を示す薬剤の探索、病巣細胞の細胞周期を選択的に停止させる薬剤の開発、等に使用できる。以下に具体例を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

例5：リポソームの調製

下記に示した割合で egg PC (フナコシ社製、No. 1201-41-0214)、egg PS (フナコシ社製、No. 1201-42-0226)、ジセチルfosフェート (DCP、フナコシ社製、No. 1354-14-8165)、J. Med. Chem., 25(12), 1500 (1982) 記載の方法で合成した疎水性ヨード化合物(3)をそれぞれナス型フラスコ内で塩化メチレンに溶解して均一溶液とした後、溶媒を減圧で留去してフラスコ底面に薄膜を形成した。この薄膜を真空で乾燥後、0.9% 生理食塩水 (光製薬社製、No. 512) を 1.5 ml 加え、超音波照射 (Branson 社製、No. 3542 プローブ型発振器、0.1 mW) を氷冷下 5 分実施することにより、均一なリポソーム分散液を得た。得られた分散液の粒径を WBC アナライザー (日本光電社製、A-1042) で測定した結果、粒子径は 40 から 65 nm であった。

リポソーム	PC	PS	DCP	化合物(3)
製剤 1	50 nmol	50 nmol	10 nmol	40 nmol
製剤 2	50 nmol	50 nmol	10 nmol	75 nmol
製剤 3	50 nmol	50 nmol	10 nmol	150 nmol

例6：血管平滑筋細胞によるリポソーム製剤の選択的取り込み（1）

例5で調整した3種類のリポソームを例1の第1図または第2図で示される平滑筋細胞培養系に下記①、②、又は③のタイミングで添加し、培養を継続した。

①第2図に示される泡沫化マクロファージを加えない培養系において、3日後にリポソーム製剤を加えて1日間培養した。

②第1図に示される泡沫化マクロファージを加える培養系において、5日後にリポソーム製剤を加えて1日間培養した。

③第1図に示される泡沫化マクロファージを加える培養系において、7日後にリポソーム製剤を加えて1日間培養した。

①から③の条件でリポソームの添加と後培養が終了後、上清を除きハンクスバッファー液（日本製薬社製、code05906、pH7.2）で3回洗浄した後、1.5%SDS溶液（和光純薬社製、199-07141）を加えて、37°Cで30分インキュベートして細胞を溶解し、細胞内に取りこまれた化合物(3)の量をHPLCで定量した。その結果を第5図に示す。この結果から、本発明のリポソームにより血管平滑筋細胞に取りこまれるヨード化合物の量は、泡沫化マクロファージの影響により増殖を開始する前と後では明瞭な差が認められる。

例7：比較例

Pharm. Res., 16(3) 420 (1999) に記載の方法に従い、化合物(3)の油滴懸濁液を調製した。化合物(3)の含有量を同じにして例6と同様の条件(①、②、及び③)で細胞培養系に加え、血管平滑筋に取りこまれた化合物(3)の量をHPLCで定量した。その結果を第6図に示す。第5図と第6図を比較すると、本発明のリポソームを用いた場合には、公知の油滴懸濁剤と比べて、泡沫化マクロファージの影響により異常増殖する血管平滑筋細胞に対して高効率かつ高選択的にヨード造影剤を集積させることができることが明らかである。

例8：血管平滑筋細胞によるリポソーム製剤の選択的取り込み（2）

例4で作成したラット（第3図）およびウサギ（第4図）の細胞を使った血管平滑筋培養系において、例5で調製した3種類のリポソームを上記①、②、又は③のタイミングで添加し、培養を継続した。細胞内に取りこまれた化合物(3)の量をHPLCで定量した。その結果を第7図及び第8図に示すが、いずれもマウス細胞の第5図と同様の結果が得られた。

例9

Invest. Radiol. 18, 275 (1983)の方法に従い、ラット大動脈に動脈硬化巣を形成させた。動脈硬化巣を形成したラットに例2で調製したリポソーム製剤3を化合物(3)に換算したMTD量である200 mg/kgを頸静脈より慎重に投与した。投与30分後、X線撮影により明瞭な動脈硬化巣の造影写真が得られた。その結果を第9図及び第10図に示す。

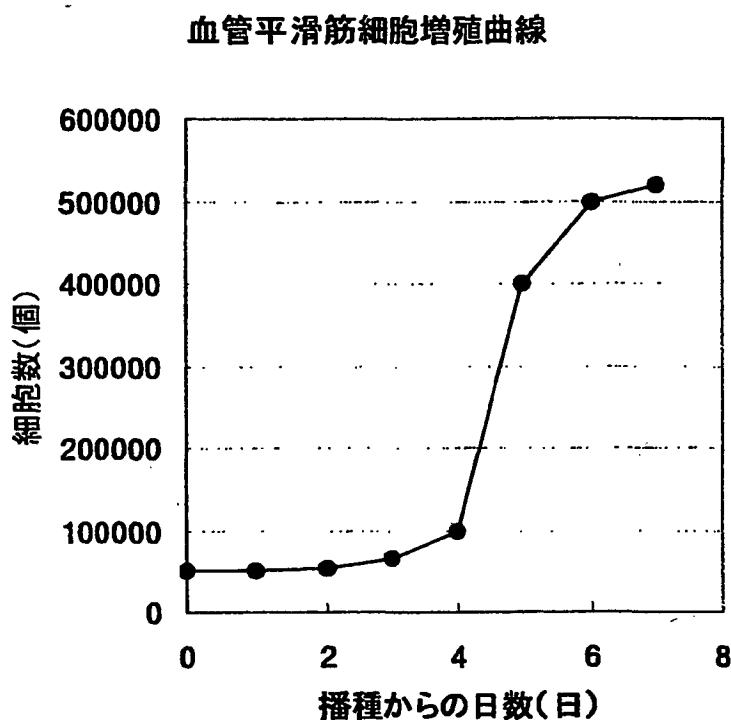
産業上の利用可能性

本発明のリポソームは、泡沫化マクロファージの影響により異常増殖する血管平滑筋細胞に対してヨード化合物を集積することができ、血管平滑筋の異常増殖に起因する血管疾患の病巣を選択的に造影するためのX線造影剤として有用である。また、本発明の培養系の作成方法により提供される培養系は、動脈硬化巣や再狭窄などの病巣の状態を再現した細胞培養系として医薬の *in vitro* スクリーニングなどに利用できる。

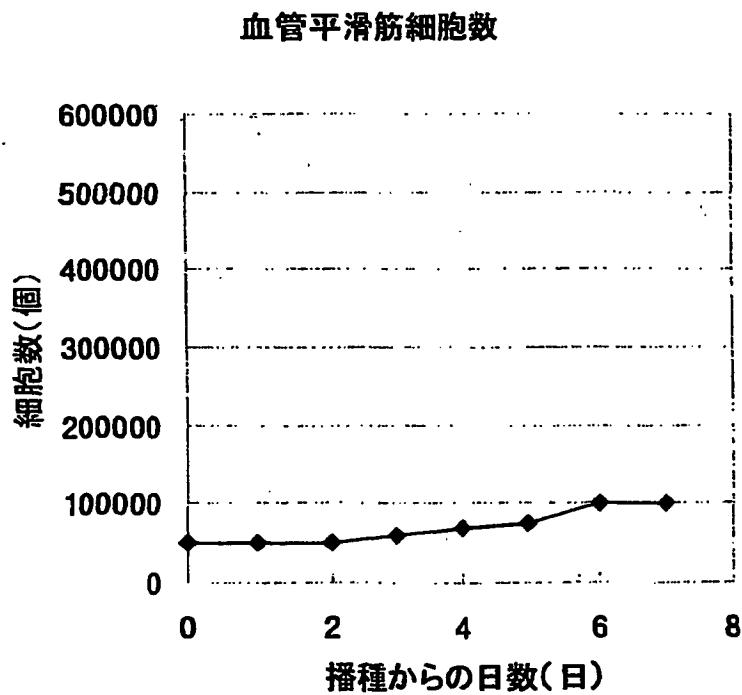
請求の範囲

1. 疎水性ヨード化合物を膜構成成分として含むリポソーム。
2. 疎水性ヨード化合物が、炭素数18以上の置換基を少なくとも1個有する1, 3, 5-トリヨードベンゼン誘導体である請求項1に記載のリポソーム。
3. ホスファチジルコリン及びホスファチジルセリンからなる群から選ばれる脂質を膜構成成分として含む請求の範囲第1項又は第2項に記載のリポソーム。
4. 炭素数6以上のアルキルのジエステルであるリン酸ジアルキルエステルを膜構成成分として含む請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載のリポソーム。
5. 炭素数18以上の置換基がコレステロール誘導体の残基である請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載のリポソーム。
6. 請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載のリポソームを含むX線造影剤。
7. 血管疾患の造影に用いるための請求の範囲第6項に記載のX線造影剤。
8. 泡沫化マクロファージの影響で異常増殖した血管平滑筋細胞の造影に用いる請求の範囲第6項に記載のX線造影剤。

第1図

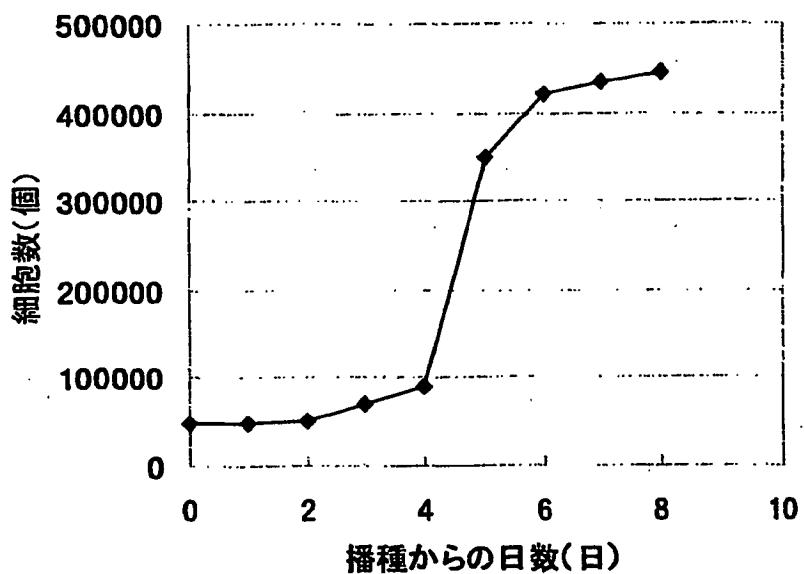


第2図



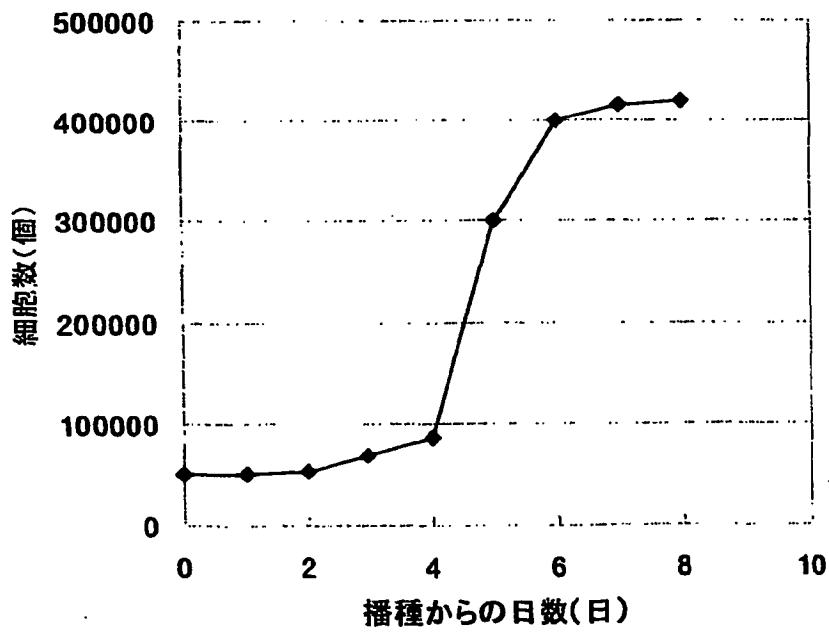
第3図

ラット血管平滑筋細胞増殖曲線

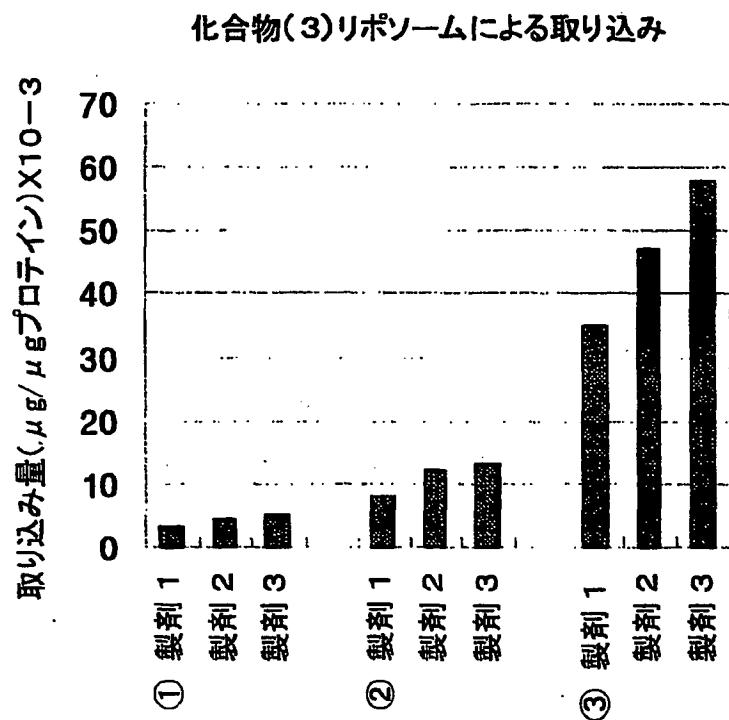


第4図

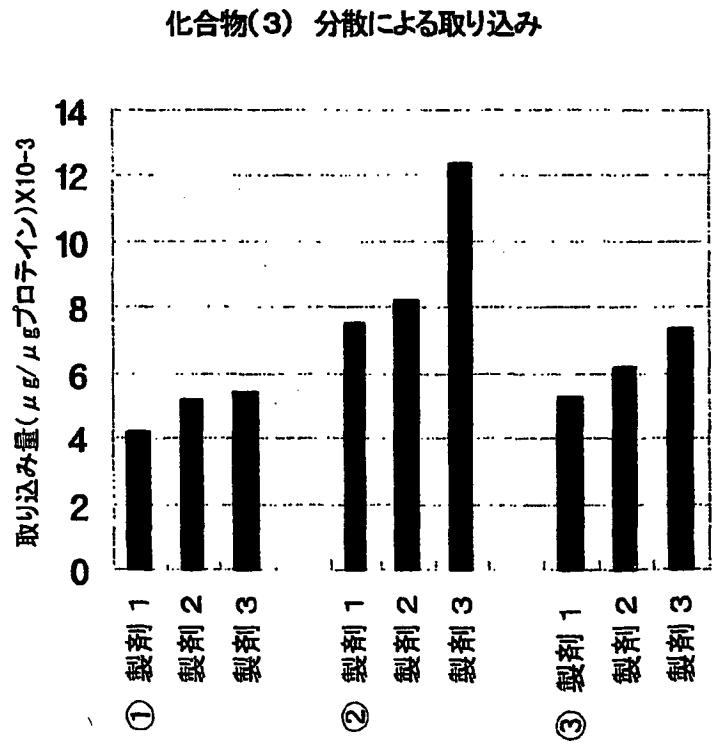
ウサギ血管平滑筋細胞増殖曲線



第5図

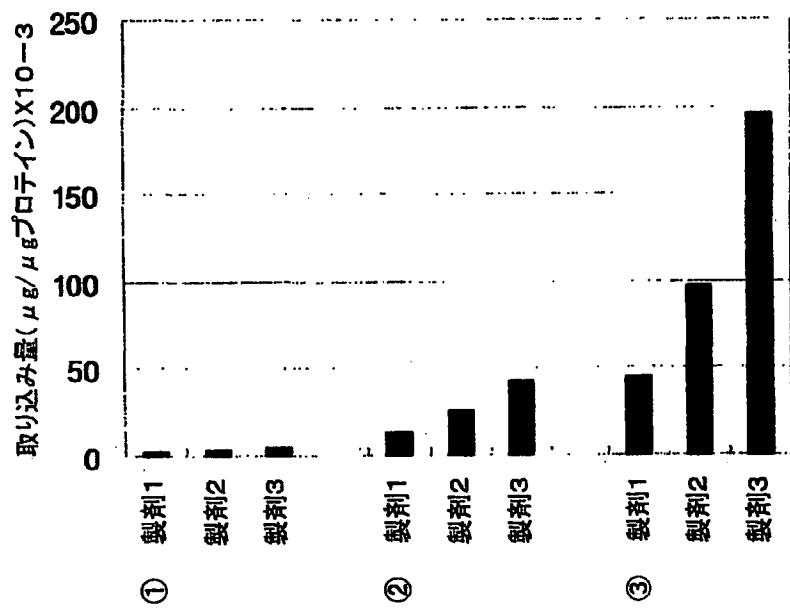


第6図



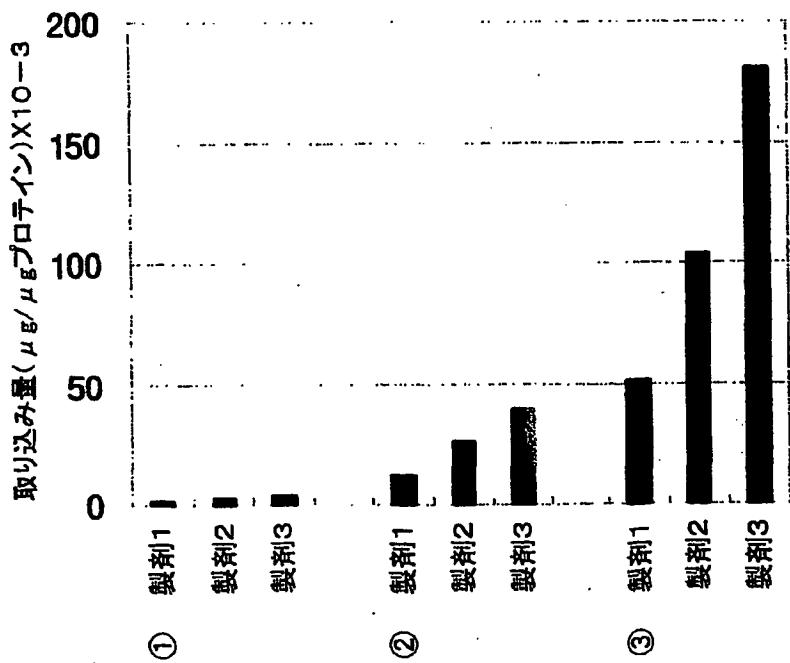
第7図

ラット平滑筋細胞取り込み



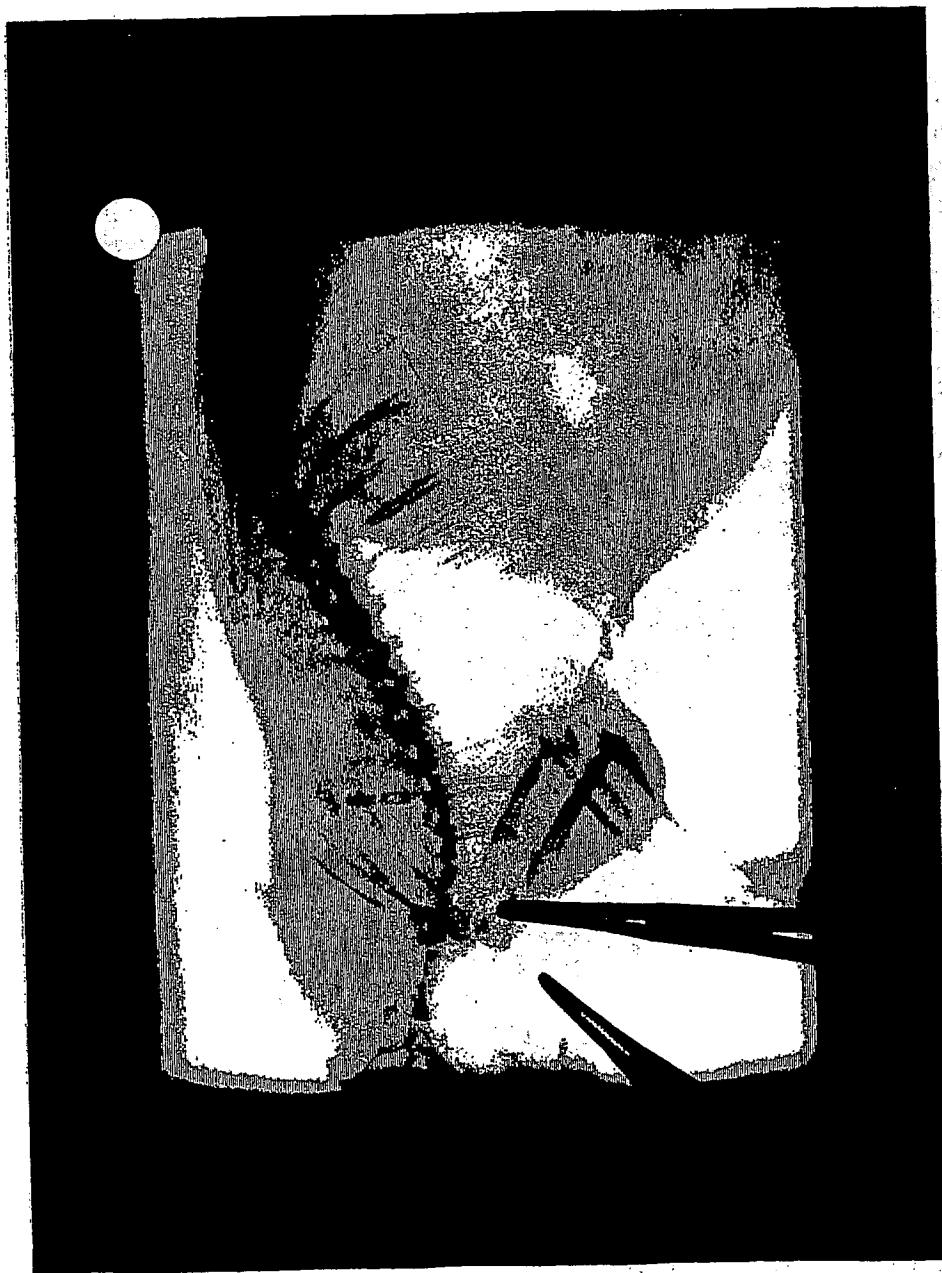
第8図

ウサギ血管平滑筋細胞取り込み



第9図 (A)

投与前



第9図 (B)

投与直後



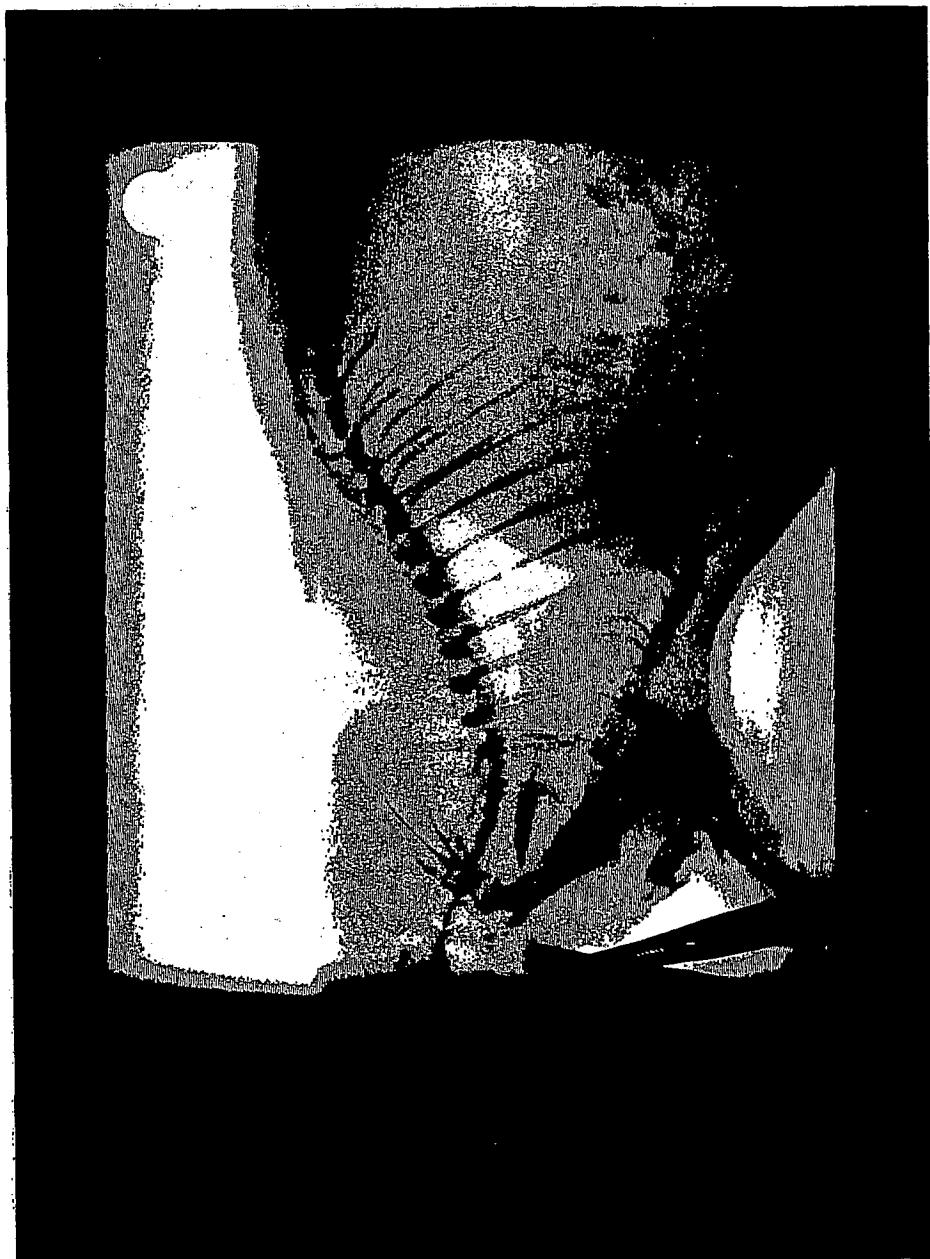
第10図 (A)

投与15分後



第10図 (B)

投与30分後



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K49/04, 9/127, 47/24, 47/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K49/04, 9/127, 47/24, 47/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1940-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), JICST (JOIS), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 92/21384, A1 (Karlshamns Lipidteknik AB.), 10 December, 1992 (10.12.92), the whole document & EP, 588869, A & JP, 6-510276, A & US, 5550263, A	1-8
Y	Xiao, W. et al., "Radiolabeled cholestryl iopanoate/acetylated low density lipoprotein as a potential probe for visualization of early atherosclerotic lesions in rabbits", Pharm. Res., Vol.16, No.3, (1999), pages 420 to 426; the whole document	1-8
Y	WO, 96/28414, A1 (Nanosystems L.L.C.), 19 September, 1996 (19.09.96), the whole document & US, 5472683, A	1-8
Y	WO, 96/25955, A1 (Bracco Reserach S.A.), 29 August, 1996 (29.08.96), the whole document & EP, 759785, A & JP, 10-500999, A	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22 June, 2001 (22.06.01)	Date of mailing of the international search report 03 July, 2001 (03.07.01)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
--	--------------------

Facsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03629

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 96/24381, A2 (Schering Aktiengesellschaft), 15 August, 1996 (15.08.96), the whole document & DE, 19606326, A & EP, 806969, A & JP, 10-513466, A	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03629

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-4,6-8
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See extra sheet.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03629

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

Claims 1 to 4, 6 and 8 relate to liposomes which contain "hydrophobic iodo compound" and "1,3,5-triiodobenzene derivative having at least one substituent carrying 18 or more carbon atoms". Although these claims involve any 1,3,5-triiodobenzene derivatives having at least one hydrophobic group or one substituent carrying 18 or more carbon atoms, compounds having such properties, it is recognized that only a part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning of Article 6 of the PCT or disclosed in the meaning of Article 5 of the PCT.

Since these claims are neither supported nor disclosed by the description, any meaningful search can be hardly practiced on the claims as a whole.

Even though the common general knowledge at the application is taken into consideration, the scope of "hydrophobic iodo compound" and "1,3,5-triiodobenzene derivative having at least one substituent carrying 18 or more carbon atoms" cannot be specified. Accordingly, these claims fail to satisfy the requirement of clearness under Article 6 of the PCT, which makes it difficult to practice any meaningful search on these claims as a whole.

Such being the case, the search has been made mainly on liposomes containing the compound as set forth in claim 5.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K49/04, 9/127, 47/24, 47/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 A61K49/04, 9/127, 47/24, 47/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1992年

日本国公開実用新案公報 1971-1992年

日本国登録実用新案公報 1994-1996年

日本国実用新案登録公報 1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)、REGISTRY (STN)、JICST (JOIS)、MEDLINE (STN)、BIOSIS (STN)、EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 92/21384, A1 (KARLSHAMNS LIPIDTEKNIK AB.) 10. December. 1992 (10. 12. 92) whole document & EP, 588869, A & JP, 6-510276, A & US, 5550263, A	1-8
Y	Xiao, W. et. al., "Radiolabeled cholestryl iopanoate/acetylated low density lipoprotein as a potential probe for visualization of early atherosclerotic lesions in rabbits", Pharm. Res., Vol. 16, No. 3 (1999) P. 420-426, whole document	1-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 06. 01

国際調査報告の発送日

03.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4C 9051

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	WO, 96/28414, A1 (Nanosystems L. L. C.) 19. September. 1996 (19. 09. 9 6) whole document & US, 5472683, A	1-8
Y	WO, 96/25955, A1 (BRACCO RESEARCH S. A.) 29. August. 1996 (29. 08. 9 6) whole document & EP, 759785, A & JP, 10-500999, A	1-8
Y	WO, 96/24381, A2 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 15. August. 1996 (1 5. 08. 96) whole document & DE, 19606326, A & EP, 806969, A & JP, 10 -513466, A	1-8

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求の範囲 1-4, 6-8 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

理由は最終頁を参照のこと。

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

(第I欄 2. の続き)

請求の範囲1~4、6、8は、「疎水性ヨード化合物」、「炭素数18以上の置換基を少なくとも1個有する1、3、5-トリヨードベンゼン誘導体」を含むリポソームに関するものである。そして、これらの請求の範囲は、1、3、5-トリヨードベンゼン誘導体に、疎水性基又は炭素数18以上の置換基を少なくとも1個有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた成分のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

したがって、これらの請求の範囲は、明細書による裏付けを欠き、開示を欠いているから、請求の範囲全体に関する有意義な調査をすることは、困難である。

また、「疎水性ヨード化合物」、「炭素数18以上の置換基を少なくとも1個有する1、3、5-トリヨードベンゼン誘導体」について、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、これらの請求の範囲は、PCT6条における明確性の要件も欠いており、これらの請求の範囲全体に関する有意義な調査をすることは、困難である。

よって、これらの請求の範囲の調査は、請求の範囲5に記載されている化合物を含有するリポソームを中心に行った。